

BAB II

METODE PENELITIAN

A. Kategori dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam jenis penelitian eksperimental dengan rancangan *pre and post test control group design*.

B. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas : Perlakuan, diberikan dengan 2 peringkat dosis
2. Variabel tergantung : kadar kolesterol darah tikus (mg/dL)
3. Variabel terkontrol : Tikus putih jantan galur Wistar, berat badan 120-250 g, umur 2,5 bulan.

C. Subjek Penelitian

Tikus putih jantan galur wistar yang didapatkan dari Peternakan Mencit dan Tikus Putih “Rumah Tiput” dengan kriterianya berupa sehat secara kondisi dan aktivitasnya normal, dan berumur sekitar 2,5 bulan ketika akan diuji.

D. Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan

Alat-alat gelas (pyrex), blender, cawan porselen, botol gelap, *rotary evaporator* (IKA RV10), timbangan analitik (OHAUS Pioneer) dengan sensitivitas 0,0001 g, tabung reaksi, *glass ware*, *water bath*, ependrof, oven, sentrifuge (Gemmy Industrial PLC-03), sentrifuge (Effendorf minispin), pipet, multi cuvette, pipet mikro (socorex) ukuran 50-1000 μ L, kandang hewan uji, pipa hematokrit, *water bath*, spektrofotometer (*Stardust MC15*), lampu UV 366 nm, kompor listrik dan peralatan penunjang lainnya.

2. Bahan uji dan lain yang digunakan

Bahan utama yaitu tempe kedelai yang berasal dari pasar Kleco, Surakarta. Bahan untuk ekstraksi yang digunakan adalah etanol 96% (teknis). Bahan untuk uji skrining fitokimia yaitu kertas saring, akuades, metanol (teknis), heksana (pa), wash benzen (teknis), etil asetat (pa), aseton (pa), asam borat (pa), asam oksalat (pa), eter (teknis), HCl 2 N (pa), etanol 96 % (teknis), dan FeCl₃. Bahan untuk uji *In Vivo* yaitu tikus putih jantan galur Wistar dengan berat badan 120-250 g, reagen kit kolesterol (Cholesterol FS dari Dsi) digunakan untuk mengukur kadar kolesterol darah, simvastatin tablet (Kimia Farma), dan diet makanan yang mengandung kolesterol tinggi seperti pellet (pakan standar); margarin; minyak jelantah; serta air.

E. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Biologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.

F. Rencana Penelitian

1. Persiapan Bahan

Sebanyak ± 1 kg tempe kedelai putih yang telah difermentasi dikeringkan menggunakan oven ± 2 hari. Tempe kedelai yang sudah kering dihaluskan dengan blender lalu diambil serbuk kering tersebut untuk dilakukan pengujian.

2. Ekstraksi

Serbuk kering dari tempe kedelai diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 1: 7 (900 g ekstrak : 6,3 L etanol 96 %). Maserasi dilakukan dengan sesekali dilakukan pengadukan selama 3 hari (dapat dilakukan berulang) dan maserat yang didapat dipisahkan dengan kertas saring. Filtrat yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 45°C sampai didapatkan $\frac{1}{4}$ volume sisanya (relatif kental dan pekat). Filtrat yang

didapat dipindahkan ke cawan porselin dan dipanaskan dengan *waterbath* hingga terbentuk ekstrak kental.

3. Uji Penapisan Fitokimia

a. Identifikasi Flavonoid

Larutan percobaan: dipanaskan sebanyak $\pm 0,5$ g serbuk simplisia selama 10 menit dalam metanol 10 ml di tangas air (10 mL sediaan minyak tempe kedelai dalam 10 mL heksana tanpa pemanasan). Selagi panas, filtrat tersebut disaring dan diencerkan dengan 10 mL air hingga dingin. Selanjutnya sebanyak 5 mL wash benzene ditambahkan dan dikocok dengan hati-hati, kemudian diamkan. Lapisan bawah yang berupa metanol diambil dan diuapkan dalam *waterbath* dengan cawan porselin. Residu yang didapat dilarutkan dalam 5 mL etil asetat dan disaring (Farnsworth, 1966).

Uji Taubeck: larutan percobaan yang didapat diuapkan hingga kering ± 1 mL, residu tersebut dibasahkan dengan aseton, dicampurkan sedikit serbuk asam oksalat dan asam borat, lakukan pemanasan yang tidak berlebihan di atas tangas air. 2 ml eter ditambahkan pada residu yang diperoleh. Dibawah UV 366 nm diamati larutan tersebut, adanya flavonoid dapat ditandai dengan fluoresensi kuning intensif pada larutan tersebut (Departemen Kesehatan RI, 1995).

b. Identifikasi Saponin

0,5 gram ekstrak kasar dimasukkan dalam tabung reaksi, dan ditambah 2 ml air panas. Larutan didiamkan sampai dingin dan dikocok selama 10 detik. Bila terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama kurang lebih 10 menit menunjukkan adanya saponin. Penambahan beberapa tetes asam klorida 2 N busa tetap stabil (Depkes RI, 2000).

c. Identifikasi Tanin

0,5 gram ekstrak kasar (± 10 mL minyak tempe kedelai) dilarutkan 2 ml etanol 96%, dan ditetaskan 3 tetes FeCl_3 . Warna biru atau hitam kehijauan yang terbentuk menunjukkan adanya tanin (Robinson, 1991).

4. Uji Aktivitas Antikolesterol Ekstrak Secara In-Vivo

a. Penyiapan hewan uji

Adaptasi hewan uji dilakukan dengan cara aklimatisasi (penyesuaian diri) tikus jantan galur Wistar selama 7 hari. Tikus yang akan dilakukan penelitian disortir dengan syarat harus sehat yang ditandai dengan warna putih bersih, mata merah jernih, tingkah laku normal dan aktif, serta bulu tidak berdiri.

b. Pembuatan model Tikus hiperkolesterol

Sebanyak 12 ekor tikus yang sudah diadaptasi dan diukur kadar awalnya diberi induksi pakan tinggi lemak/ kolesterol selama 55 hari dan dilanjutkan dengan perlakuan lengkap dengan ekstrak selama 14 hari. Tikus ditetapkan sebagai tikus hiperkolesterol ketika kadar kolesterol > 150 mg/dL (Paget, 1970). Setelah induksi selama 55 hari rata-rata kolesterol dari semua tikus menunjukkan telah terjadi hiperkolesterol. Pembuatan pakan tinggi kolesterol tersebut dibuat dengan komposisi :

R/Pellet (pakan standar)	500 g
Minyak Jelantah	100 mL
Mentega	50 g

Komposisi tersebut dicampur menjadi satu dalam suatu wadah hingga tercampur semua secara merata kemudian tinggal diberikan kepada hewan uji.

Komposisi pakan BR standar dari PT Comfeed:

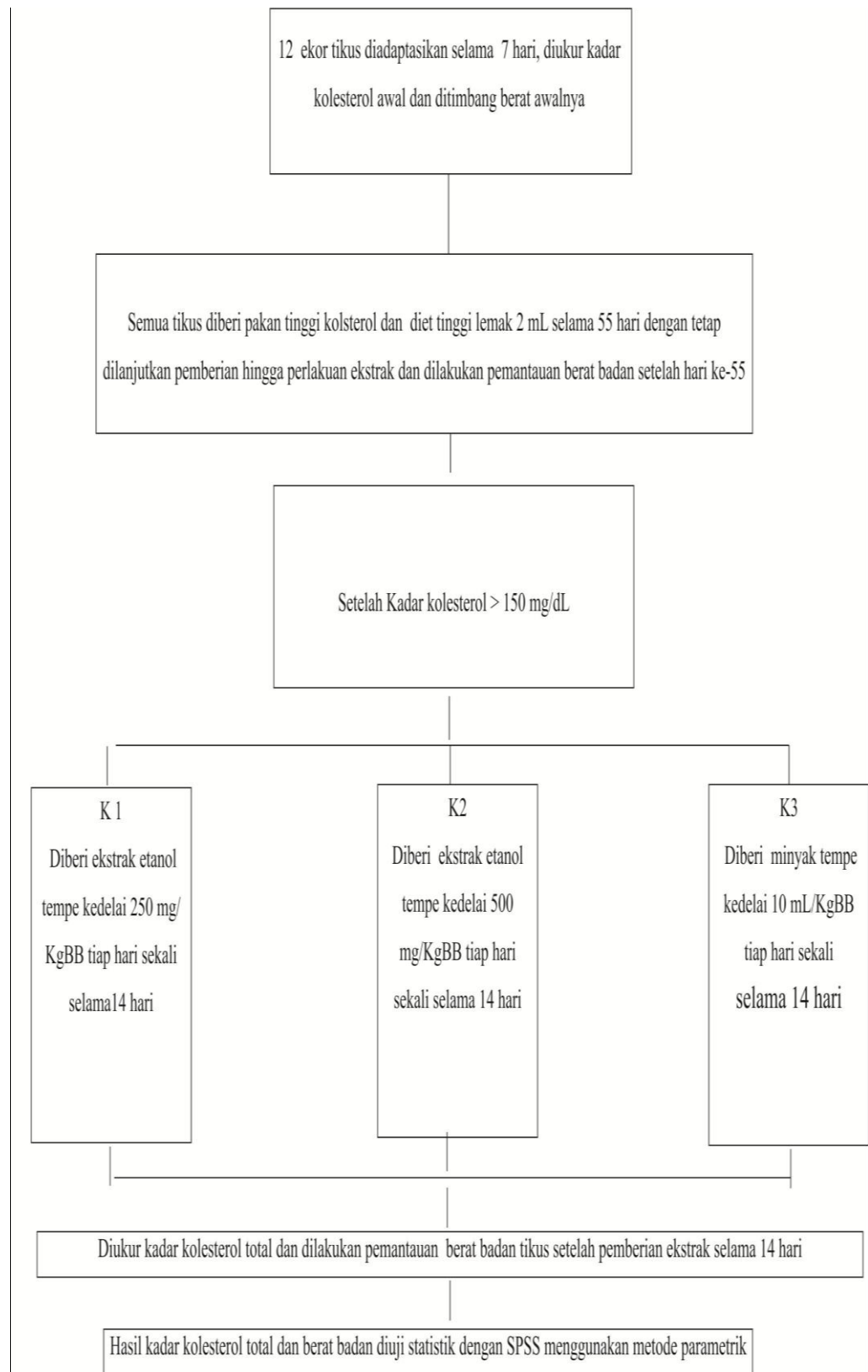
Air	12 %
Protein Kasar	21 %
Lemak	4 %
Serat Kasar	4,5 %
Kalsium	1,2 %
Fosfor	0,7 %
Coccidiostat	0,9 %

c. Perlakuan ekstrak etanol tempe kedelai dan minyak tempe kedelai

Hewan uji sebanyak 12 tikus dibagi menjadi 3 kelompok dan diberi perlakuan selama 14 hari untuk menurunkan kadar kolesterol dengan tetap diberikan pakan tinggi lemak dan kolesterol (*post-test*). Kelompok 1 diberikan ekstrak etanol tempe kedelai 250 mg/KgBB, kelompok 2 diberikan ekstrak etanol tempe kedelai 500 mg/KgBB, dan kelompok 3 diberikan minyak tempe kedelai 10 mL/KgBB. Perlakuan tersebut diberikan setiap hari sekali pada waktu sore hari diatas jam 16.00 WIB. Setelah diberi ekstrak selama 14 hari lalu diukur kadar kolesterol total.

d. Pengamatan berat badan

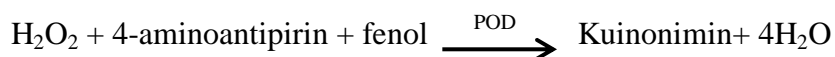
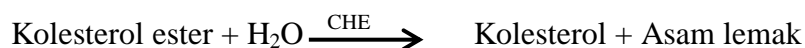
Pengamatan berat badan dilakukan agar dapat melihat pengaruh antara kenaikan kolesterol dan berat badan. Pengamatan ini juga sekaligus untuk melihat efek lain dari pemberian ekstrak terhadap penurunan berat badan. Pengamatan berat badan dilakukan ketika sebelum pengukuran kadar awal kolesterol, kadar kolesterol setelah 55 hari, dan pemberian ekstrak selama 14 hari



Gambar 2. Skema pengujian aktivitas antihiperkolesterol ekstrak etanol tempe kedelai

5. Pengukuran dan penetapan kadar kolesterol

Pengukuran kadar kolesterol awal (*baseline*) dilakukan sebelum diberi pakan tinggi lemak dan kolesterol, sedangkan hiperkolesterol diukur 40 hari (kelompok kontrol) dan 55 hari (kelompok perlakuan) sesudah diberi pakan tinggi lemak dan kolesterol, dan penurunan kolesterol diukur setelah 2 minggu pemberian ekstrak. Pengambilan sampel darah dilakukan pada vena mata sebanyak $\pm 1,5$ mL. Metode yang digunakan dalam penetapan kolesterol total yaitu metode CHOD-PAP (*enzymatic photometric test*) menggunakan Reagen Kit (Cholesterol FS dari Diasys).



(Diasys, 2012)

Tabel 2. Prosedur pengukuran kadar kolesterol dengan metode CHOD-PAP

	Blangko	Sampel/ standar
Sampel/ standar	-	5 μL
Aquadest	5 μL	-
Reagen	500 μL	500 μL

Darah yang telah diambil, disentrifugasi dan diambil serumnya. Serum yang ada dicampur dan diinkubasi selama 20 menit pada 20°C - 25°C atau 10 menit pada 37°C . kemudian dibaca absorbansinya pada 500 nm terhadap blangko reagen tidak lebih dari 60 menit.

G. Analisa Data

Analisis data statistik dilakukan berupa uji normalitas untuk melihat distribusi data. Data yang akan diuji tersebut diperoleh dari konsentrasi berupa kadar kolesterol awal (baseline), kadar setelah diinduksi hiperkolesterol 55 hari (pre-test), setelah dilakukan treatment (post-test) dihitung besar rata-rata dan SD penurunan kadar kolesterol total serta berat badan. Kemudian diolah dengan SPSS (*statistical product and service solution*) versi 23 untuk windows dengan menggunakan metode Shapiro-Wilk. P-value yang didapat $> 0,05$ berarti data terdistribusi normal. Data dari uji Normalitas yang normal dilanjutkan ke uji parametrik (uji T dan Anova) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan diantara berbagai kelompok perlakuan. Karena hasil uji T dan Anova $P < 0,05$ sehingga dilanjutkan ke uji Post Hoc untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna antara rata-rata dua populasi yang distribusinya sama.